This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images, please do not report the images to the Image Problem Mailbox.

G299 G310 G399 G530 G543 G553 G563 G573 G583 G599 H100 H101 H102
H103 H121 H122 H123 H141 H142 H143 H181 H182 H183 H201 H202 H211
H401 H402 H403 H404 H405 H421 H422 H423 H424 H441 H442 H443 H444
H481 H482 H483 H484 H521 H522 H523 H541 H542 H543 H581 H582 H583
H601 H602 H603 H604 H608 H609 H621 H622 H623 H641 H642 H643 H681
H682 H683 H684 H685 H686 H689 J0 J012 J013 J014 J131 J132 J133 J171
J172 J173 J211 J212 J231 J232 J271 J272 J273 J3 J311 J331 J332 J371
J372 J373 K352 K353 K399 K431 K432 K441 K499 K510 K620 K810 K820
K830 L250 L299 L340 L399 L410 L431 L463 L499 L532 L610 L699 L722
L724 M113 M115 M116 M119 M210 M211 M212 M213 M214 M215 M216 M220
M221 M222 M223 M224 M225 M231 M232 M233 M240 M250 M262 M271 M272
M273 M280 M281 M282 M283 M311 M312 M313 M314 M315 M316 M321 M322
M323 M331 M332 M333 M334 M340 M342 M343 M344 M349 M351 M353 M361
M362 M371 M372 M373 M381 M382 M383 M391 M392 M393 M411 M510 M511
M512 M513 M520 M521 M522 M523 M530 M531 M532 M533 M540 M541 M542
M543 M620 M630 M640 M650 M710 M903 M904 P210 P522 P526 P616 V814
9025-02401-N 9025-02402-N 00068
Ring Index Numbers: 00068

?S PN=(DD 158109 OR DD 270382 OR DD 296075)
1 PN=DD 158109
1 PN=DD 270382
1 PN=DD 296075
S2 3 PN=(DD 158109 OR DD 270382 OR DD 296075)
?T 2/9/ALL

2/9/1
DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2000 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

009005596 **Image available**
WPI Acc No: 1992-132891/199217
XRAM Acc No: C92-062202
Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV - consist of an aminoacid amide such as L-isoleucine pyrrolide, -thiazide, prolinol or -thio prolinol
Patent Assignee: LUTHER-UNIV HALLE (UYHA-N)
Inventor: BARTH A; BORN I; DEMUTH H U; FAUST J; HEINS J; NEUBERT K; RAHFELD J U; STEINMETZ T
Number of Countries: 001 Number of Patents: 001
Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week	
DD 296075	A	19911121	DD 331544	A	19890807	199217	B

Priority Applications (No Type Date): DD 331544 A 19890807
Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
DD 296075	A		7		

Abstract (Basic): DD 296075 A

The prepn. of new inhibitors of dipeptidyl peptidase (IV) comprises synthesising an aminoacid amide of formula A-B (I) from XAY or XA(Z)Y and B using conventional peptide chemistry methods for forming amide bonds, pref. the mixed anhydride method or active ester method.

The protecting gps. X and Y are removed with conventional w deblocking methods (acidolysis) and if necessary purifying by recrystallisation or column chromatography on Sephadex G10 or weakly acidic ion exchangers. In (I) A = an alpha-aminoacid of structure

B3

H2N-CHRCOOH in which R is an aliphatic, aromatic or heterocyclic gp. and is e.g. ala, val, leu, ser, thre, cys, methionine, pro, lys, arg, his, glutamic acid, glu, aspartic acid, asp, phenyl, tyr, tryptophan, norvaline, norleucine, ornithine, 2,4-diaminobutyric acid, alpha-aminobutyric acid, pref. isoleucine each in L configuration, alpha-aminosiobutyric acid and in the cases of trifunctional aminoacids, the cores. N or C omega or O or D substd. derivs. are in the L-config., esp. N omega-acyl, C omega or D-benzylamino acids; or A = an alpha- iminocarboxylic acid of structure (a), where n = 2,3 or 4 and is e.g. L-acetidine-2-carboxylic acid, L-proline, L-pipe-colonic acid and related cpds. such as L-3,4-dehydroproline, L-thioproline and the corresp. halo-, NO2, OH-, CN- lower opt. branched alkyl or alkoxy-substd. derivs. e.g. L-4-hydroxyproline; B = special heterocyclic amines or heterocyclic aminaldehydes; X = an alpha- amino protecting gp. conventionally used in peptide chemistry, pref. tert. butoxycarbonyl; Z = a side chain protecting gp. (depending on the structure of the trifunctional aminoacid) of the teter. butyl type (tert. butyloxycarbonyl, tert. butyl ester, O or S-tert butyl); X = OH, active ester pref. pentafluorphenyl or N-hydroxysuccinimide active ester pref. pentafluorphenyl or N-hydroxysuccinimide ester.

Title Terms: INHIBIT; DI; PEPTIDYL; PEPTIDASE; IV; CONSIST; AMINOACID; AMIDE; ISOLEUCINE; PYRROLIDE; THIAZIDE; PROLINOL; THIO; PROLINOL

Derwent Class: B05

International Patent Class (Additional): C07D-277/04; C07D-295/04; C07D-403/02; C07D-409/02; C12N-009/99

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B06-D01; B07-H; B12-F04; B12-F05; B12-G01B3; B12-G07; B12-H02; B12-H04; B12-K04A

Chemical Fragment Codes (M2):

01 D010 D011 D020 D601 F011 F012 F013 F014 F019 F400 F410 F423 F433 F499 F511 F513 F521 F553 F599 F610 F653 F710 G001 G010 G011 G100 H1 H100 H101 H181 H182 H2 H211 H321 H341 H401 H421 H441 H442 H481 H498 H521 H541 H581 H598 H600 H621 H641 J0 J011 J012 J271 J3 J371 J372 L142 L250 L463 M210 M211 M212 M213 M214 M215 M216 M220 M221 M222 M231 M232 M233 M240 M271 M280 M281 M312 M313 M314 M315 M321 M331 M333 M340 M342 M343 M349 M371 M373 M381 M391 M412 M413 M414 M416 M510 M511 M521 M522 M530 M531 M540 M720 M903 M904 N231 N241 N261 N331 N361 N511 P526 P616 P813 V814 9217-04301-P 9217-04302-P

Generic Compound Numbers: 9217-04301-P; 9217-04302-P

2/9/2

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2000 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

008113385

WPI Acc No: 1990-000386/199001

XRAM Acc No: C90-000177

XRPX Acc No: N90-000215

Dipeptidyl peptidase IV colorimetric determn. - using e.g. glycol- or alanyl-l-proline hydrazide as substrate and p-dimethylamino-benzaldehyde as colour reagent

Patent Assignee: LUTHER-UNIV HALLE (UYHA-N)

Inventor: BARTH A; BORN I; NEUBERT K; REICHELT D; REICHELT I

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PATENTSCHRIFT

B3

(12) Ausschli ßungspatent

(11) DD 296 075 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 07 D 295/04
C 07 D 277/04
C 07 D 403/02
C 07 D 409/02
C 12 N 9/99

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 07 D / 331 544 5 (22) 07.08.89 (44) 21.11.91

(71) siehe (73)
(72) Neubert, Klaus, Doz. Dr. sc. nat. Dipl.-Chem.; Born, Ilona, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Faust, Jürgen, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Heins, Jochen, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Barth, Alfred, Prof. Dr. sc. nat. Dipl.-Chem.; Demuth, Hans-Ulrich, Dr. sc. nat. Dipl.-Biochem.; Rahfeld, Jens U., Dipl.-Biochem.; Steinmetzer, Torsten, Dipl.-Biochem., DE
(73) Martin-Luther-Unviersität Halle–Wittenberg, Universitätsplatz 10, O - 4010 Halle, DE
(74) siehe (73)

(54) Verfahren zur Herstellung neuer Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV

(55) Inhibitoren; Dipeptidyl Peptidase IV; Aminosäurederivate; heterocyclische Amidstruktur; Herstellung; kompetitive Hemmung; Therapeutika; Medizin; Immunbiochemie; pharmazeutische Industrie

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung neuer Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV auf der Basis spezieller Aminosäurederivate mit heterocyclischer Amidstruktur, die die katalytische Aktivität des Enzyms in gereinigter Form als auch in normalen oder pathologisch veränderten menschlichen und tierischen Seren, in Organen, Geweben und Zellen menschlicher, tierischer, pflanzlicher und mikrobieller Herkunft sowohl in vivo als auch in vitro kompetitiv hemmen und als potentielle Therapeutika in Bereichen der durch die Dipeptidyl Peptidase IV regulativ gesteuerten Stoffwechselprozesse zur Anwendung kommen. Die Erfindung ist zur Anwendung in der Medizin, insbesondere in der Immunbiologie und Pathologie und für die pharmazeutische Industrie von Bedeutung.

ISSN 0433-6461

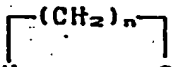
7 Seiten

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung neuer Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV, gekennzeichnet dadurch, daß Aminosäureamide der allgemeinen Formel I

A–B (I)

synthetisiert werden, worin A und B wie folgt definiert sind:
A = α-Aminocarbonsäure der Struktur H_2N–CHR–COOH (R = aliphatischer, aromatischer oder heterocyclischer Rest, beispielsweise Alanin, Valin, Leucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Prolin, Lysin, Arginin, Histidin, Glutaminsäure, Glutamin, Asparaginsäure, Asparagin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Norvalin, Norleucin, Ornithin, 2,4-Diaminobuttersäure, α-Aminobuttersäure, vorzugsweise Isoleucin- jeweils in der L-Konfiguration, α-Aminoisobuttersäure, im Falle der trifunktionellen Aminosäuren auch die entsprechenden N^{ω}- oder C^{ω}- oder O- bzw. S-substituierten Derivate in der L-Konfiguration, vorzugsweise N^{ω}-Acyl, C^{ω}- bzw. O-Benzyl-Aminosäuren, beispielsweise N^{ε}-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, O-Benzyl-L-Serin, O-Benzyl-L-Tyrosin, L-Glutaminsäure-γ-benzylester, L-Asparaginsäure-β-benzylester sowie entsprechende, insbesondere durch Halogen, Nitro-, Hydroxy-, niedere lineare oder verzweigte Alkyl- bzw. Alkoxy-Reste ringsubstituierte Derivate des L-Phenylalanins, L-Tyrosins, L-Tryptophans, vorzugsweise 4-Nitro-L-Phenylalanin bzw. α-Iminocarbonsäuren



der Struktur mit n = 2,3,4 beispielsweise L-Azetidin-2-carbonsäure, L-Prolin, L-Pipecolinsäure, verwandte Verbindungen wie L-3,4-Dehydroprolin, L-Thioprolin sowie die entsprechenden durch Halogen-, Nitro-, Hydroxy-, Cyano-, niedere lineare oder verzweigte Alkyl- bzw. Alkoxyreste substituierten Derivate, beispielsweise L-4-Hydroxyprolin.
B = spezielle heterocyclische Amine oder heterocyclische Aminaldehyde: Pyrrolin, Thiazolin, Piperidin, Morpholin, Pyrazolin, Pyrazolidin, Piperazin, Oxazolin, Oxazolidin, Imidazolin, Imidazolidin, Azetidin, Aziridin vorzugsweise Pyrrolidin, Thiazolidin, L-Prolinal, L-Thioprolinal, sowie die entsprechenden durch Halogen-, Nitro- bzw. Alkylreste substituierten Derivate und ihre Darstellung ausgehend von X–A–Y bzw. X–A(Z)–Y (im Falle einer trifunktionellen Aminosäure für A) durch Umsetzung mit B, worin A und B wie oben definiert sind, X für eine in der Peptidchemie gebräuchliche α-Aminoschutzgruppe, vorzugsweise der tert. Butyloxycarbonyl-Rest steht, Z in Abhängigkeit von der Struktur der trifunktionellen Aminosäure eine gebräuchliche Seitenkettenschutzgruppe, bevorzugt vom tert. Butyl-Typ (tert. Butyloxycarbonyl, tert. Butylester, O- oder S-tert. Butyl) darstellt, und Y Hydroxy, Aktivester, bevorzugt Pentafluorphenyl bzw. N-Hydroxysuccinimidester bedeutet nach den in der Peptidchemie üblichen Methoden zur Knüpfung der Amidbindung, vorzugsweise über die Mischanhydridtechnik bzw. die Aktivestermethode erfolgt und anschließend die für X und Z eingesetzten Schutzgruppen mit den in der Peptidchemie üblichen Deblockierungsverfahren für die oben genannten Schutzgruppen vom tert. Butyl-Typ durch Acidolyse entfernt und falls erforderlich durch Umkristallisation bzw. durch Säulenchromatographie an Sephadex G 10 oder schwach saurem Ionenaustauscher gereinigt werden.
2. Verfahren zur Herstellung neuer Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Aminosäurederivate
 - Ile-pyrrolidid,
 - Ile-thiazolidid,
 - Ile-prolinal,
 - Ile-thioprolinal,
 - N^{ε}-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-pyrrolidid,
 - N^{ε}-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-thiazolidid,
 - N^{ε}-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-prolinal
 - N^{ε}-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-thioprolinal.

hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkpotenz bevorzugte Verbindungen darstellen.

3. Verfahren zur Herstellung neuer Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidas IV nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet dadurch, daß diese und/oder deren pharmazeutisch annehmbare Salz die katalytisch Aktivität des Enzyms in gereinigter Form als auch in normalen oder pathologisch veränderten menschlichen und tierischen Organen, Geweben und Zellen menschlicher, tierischer, pflanzlicher und mikrobieller Herkunft sowohl in vivo als auch in vitr hemmen und als potentielle Therapeutika in Bereichen der durch die Dipeptidyl Peptidase IV regulativ gesteuerten Stoffwechselprozesse für die Medizin von Bedeutung sind.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung neuer Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV (DPIV) auf der Basis spezieller Aminosäurederivate mit heterocyclischer Amidstruktur. Die erfindungsgemäßen Verbindungen hemmen die katalytische Aktivität der Dipeptidyl Peptidase IV kompetitiv und können als reversible DD IV-Inhibitoren im Bereich medizinisch-biologischer Prozesse, an denen das Enzym funktionell beteiligt ist, als potentielle Diagnostika bzw. Therapeutika zur Anwendung kommen. Die Erfindung ist zur Anwendung in der Human- und Veterinärmedizin, Pathobiochemie, Pharmakologie, Immunbiochemie und für die pharmazeutische Industrie geeignet.

Charakteristika des bekannten Standes der Technik

Die Dipeptidyl Peptidase IV ist ein im Säugerorganismus ubiquitär vorkommendes Enzym. Sie ist eine Serinprotease mit ausgeprägter Substratspezifität, die konsekutiv vom N-terminalen Ende einer Peptid- oder Proteinkette Dipeptide der Struktur X_{aa}-Pro und X_{aa}-Ala abspaltet, vorausgesetzt in dritter Position der Sequenz befinden sich keine Prolin- oder Hydroxyprolin-Reste (vgl. Küllertz et al., Dipeptidyl Peptidase IV – Chemie, Biochemie und physiologische Aspekte, Beiträge zur Wirkstofforschung Heft 11, Akademie-Industrie-Komplex Arzneimittelforschung 1981). Neuere Befunde zeigen, daß die Dipeptidyl Peptidase IV ein physiologisch-biochemisch relevantes Enzym zu sein scheint, das an einer Reihe von Stoffwechselprozessen, u. a. der Blutdruckregulation, Blutgerinnung und Proliferationsprozessen funktionell beteiligt ist (vgl. G. Küllertz et al., Dipeptidyl Peptidase IV-Biochemie, Physiologie und Pathobiochemie, Beiträge zur Wirkstofforschung, Heft 27, Akademie-Industrie-Komplex Arzneimittelforschung 1986). Bekannt ist, daß X_{aa}-Pro- bzw. X_{aa}-Ala-Dipeptide als kompetitive Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV wirksam sind, wobei ihre inhibitorische Wirkpotenz von der Struktur des N-terminalen Aminosäure X_{aa} abhängig ist. Insgesamt gesehen ist aber ihre inhibitorische Wirksamkeit nicht stark ausgeprägt (H. U. Demuth, Dissertation A, Math.-Nat. Fakultät der Universität Halle 1981). Darüber hinaus wurden kürzlich irreversible Inhibitoren (Acylenzyminhibitoren) für die Dipeptidyl Peptidase IV vom Dipeptidyl-O-Aroyl-hydroxylamin-Typ beschrieben (vgl. H. U. Demuth et al., J. Enzyme Inhibition [1988], 2, 129). Bei solchen Inhibitoren sind toxikologische Bedenken bei In-vivo-Untersuchungen nicht auszuschließen. Außerdem ist im Falle eines therapeutischen Einsatzes von DP IV-Inhibitoren der reversiblen Hemmung von Enzymaktivitäten der Vorzug zu geben.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, einfach herstellbare, hochwirksame reversible Inhibitoren für die Dipeptidyl Peptidase IV auf der Basis spezieller Aminosäurederivate mit heterocyclischer Amidstruktur zur Verfügung zu stellen, die als gut verträgliche Substanzen sowohl in vitro als auch in vivo die katalytische Aktivität der DP IV kompetitiv hemmen, wobei zweckgebunden in Abhängigkeit von der Molekülstruktur eine graduelle Abstufung ihrer inhibitorischen Potenz erreicht werden kann und die bevorzugt in der Medizin, sowohl im Bereich der Diagnostik als auch in der Therapie von Bedeutung sein könnten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Inhibitoren für die Dipeptidyl Peptidase IV vom Aminosäureamid-Typ zu entwickeln, die reversibel die katalytische Aktivität der DP IV hemmen und sich durch folgende Vorteile auszeichnen:

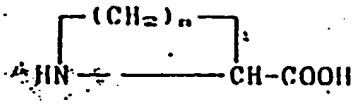
1. Einfache Molekülstruktur
2. Einfache und damit kostengünstige Herstellung
3. Gezielte Modulierung der inhibitorischen Wirkpotenz durch Strukturmodifikation
4. Günstige physikalisch-chemische Parameter im Sinne einer hohen Penetrierfähigkeit
5. Hohe Bioverfügbarkeit am Wirkort

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß Aminosäureamide der allgemeinen Formel I

A–B (I)

synthetisiert werden, w rin A und B wie folgt definiert sind:
A = α-Aminocarb nsäure der Struktur H_2N–CHR–COOH (R-aliphatischer, aromatischer oder heterocyclischer Rest): beispielsweise Alanin, Valin, Leucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Prolin, Lysin, Arginin, Histidin, Glutaminsäure, Glutamin, Asparaginsäure, Asparagin, Phenylalanin, Tyr sin, Tryptophan, Norvalin, N rleucin, Ornithin, 2,4-Diaminobuttersäur , α-Aminobuttersäure, vorzugsweise Isoleucin- jeweils in der L-Konfiguration, α-Amin isobuttersäure, im

Fall der trifunktionellen Aminosäuren auch di entsprechenden N^{ω}- oder C^{ω}- der O- bzw. S-substituierten Derivate in der L-Konfiguration, vorzugsweise N^{ω}-Acyl-, C^{ω}- bzw. O-Benzyl-Aminosäuren, beispielsweise N^{ε}-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, O-Benzyl-L-Serin, O-Benzyl-L-Tyrosin, L-Glutaminsäure-γ-benzylester, L-Asparaginsäure-β-benzylester s wi entsprechende, insbesonder durch Halogen-, Nitro-, Hydroxy-, niedere lineare der verzweigte Alkyl- bzw. Alkoxy-Reste ringsubstituierte Derivat des L-Phenylalanins, L-Tyr sins, L-Tryptophans, v rzugsweise 4-Nitro-L-Phenylalanin, bzw. α-Iminocarbonsäuren der Struktur



mit n = 2,3,4, beispielsweise L-Azetidin-2-carbonsäure, L-Prolin, L-Pipecolinsäure, verwandte Verbindungen, wie L-3,4-Dehydroprolin, L-Thioprolin sowie die entsprechenden durch Halogen-, Nitro-, Hydroxy-, Cyano-, niedere lineare oder verzweigte Alkyl bzw. Alkoxyreste substituierten Derivate, beispielsweise L-4-Hydroxyprolin.
B = spezielle heterocyclische Amine oder heterocyclische Aminaldehyde: Pyrrolin, Thiazolin, Piperidin, Morpholin, Pyrazolin, Pyrazolidin, Piperazin, Oxazolin, Oxazolidin, Imidazolin, Imidazolidin, Azetidin, Aziridin, vorzugsweise Pyrrolidin, Thiazolidin, L-Prolinal, L-Thioprolinal, sowie die entsprechenden durch Halogen-, Nitro- bzw. Alkylreste substituierten Derivate.
Einige als DP IV-Inhibitoren bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen sind die Aminosäurederivate:

Ile-pyrrolidid,
Ile-thiazolidid,
Ile-prolinal,
Ile-thioprolinal,
N^{ε}-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-pyrrolidid,
N^{ε}-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-thiazolidid,
N^{ε}-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-prolinal,
N^{ε}-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-thioprolinal.

Die Darstellung der erfindungsgemäßen Aminosäureamide als reversible Inhibitoren der DP IV erfolgt ausgehend von X–A–Y bzw. X–A(Z)–Y (im Falle einer trifunktionellen Aminosäure für A) durch Umsetzung mit B, worin A und B wie zuvor definiert sind, X für eine in der Peptidschicht gebräuchliche α-Aminoschutzgruppe steht (vgl. E. Wünsch, Synthese von Peptiden in Houben Weyl Band 15/I, Methoden der organischen Chemie, Ed. E. Müller, Georg-Thieme-Verlag Stuttgart 1974), vorzugsweise ein tert. Butyloxycarbonyl-Rest, Z in Abhängigkeit von der Natur der trifunktionellen Aminosäure eine gebräuchliche Seitenkettenschutzgruppe darstellt, bevorzugt vom tert. Butyl-Typ, d.h. für den Schutz der N^{ω}-Aminofunktion kommt der tert. Butyloxycarbonyl-Rest, für die Blockierung der ω-ständigen Carboxygruppen der tert. Butylester und für Hydroxy- bzw. Thiolfunktionen der tert. Butyl-Rest zum Einsatz und Y Hydroxy, Aktivester, bevorzugt Pentafluorphenyl- bzw. N-Hydroxysuccinimidester bedeutet, nach den in der Peptidchemie üblichen Methoden zur Knüpfung der Amidbindung nämlich N,N-Dicyclohexylcarbodiimid, N,N-Dicyclohexylcarbodiimid/Additiva (bevorzugt 1-Hydroxybenzotriazol), aktivierte Ester, Mischanhydrid, Säurechlorid (vgl. E. Wünsch s.o.) oder 2-(1H-Benzotriazol-1-yl-)-1,1,3,3-tetramethyluroniumsalze (vgl. R. Knorr et al., Abstracts 20th Europ. Peptide Symposium Tübingen 1988) bzw. Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)phosphoniumsalze (vgl. A. Fournier et al., Int J. Peptide Protein Res., 1988, 31, 86) zu den geschützten Aminosäureamiden der allgemeinen Formel II und III

X–A–B (II)

X–A(Z)–B (III)

mit A, B, X, Z in der obigen Definition.

Vorzugsweise erfolgte die Knüpfung der Amidbindung zwischen A und B über die Mischanhydridtechnik bzw. die Aktivestermethode, wobei bevorzugt N-Hydroxysuccinimid- oder Pentafluorphenylester zum Einsatz kommen. Die erhaltenen geschützten Aminosäureamide der allgemeinen Formel II und III können, falls erforderlich, durch Umkristallisation bzw. durch Säulenchromatographie an Kieselgel oder LH-20 gereinigt werden. Nach gleichzeitiger oder nacheinander geschalteter Abspaltung der für X und Z eingesetzten Schutzgruppen mit den in der Peptidchemie üblichen Deblockierungsverfahren (vgl. E. Wünsch s.o.) für die genannten bevorzugten Schutzgruppen tert. Butyloxycarbonyl, tert. Butylester, tert. Butyl durch Acidolyse (u.a. mittels HCl/Essigsäure; HCl/Essigester; HCl/Dioxan; Trifluoressigsäure gegebenenfalls in Gegenwart von Kationenfängern) erhält man die gewünschten Aminosäureamide der allgemeinen Formel I, die, falls erforderlich, durch Umkristallisation bzw. durch Säulenchromatographie an Sephadex G 10 oder an schwach sauren Ionenaustauschern gereinigt werden können.
Die erfindungsgemäß erhaltenen Aminosäurederivate mit heterocyclischer Amidstruktur gemäß Formel I und/oder deren pharmazeutisch annehmbare Salze können als reversible Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV die katalytische Aktivität des Enzyms in gereinigter Form als auch in normalen oder pathologisch veränderten menschlichen und tierischen Seren, in Organen, Geweben und Zellen menschlicher, tierischer, pflanzlicher und mikrobieller Herkunft sowohl in vivo als auch in vitro hemmen und als potentielle Therapeutika in Bereichen, der durch die Dipeptidyl Peptidase IV regulativ gesteuerten Stoffwechselprozesse, vorzugsweise im Rahmen der Blutdruckregulation, der Blutgerinnung, der Zellproliferation, aber auch im Processing biologisch aktiv r prolinhaltiger Peptide zur Anwendung kommen.
Die Erfindung soll anhand v n Ausführungsbeispielen näher erklärt werden, ohne sie einzuschränken.

Ausführungsbeispiele

Es werden folgende Abkürzungen verwendet:
Aminosäuresymbole entsprechend IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, Biochem. J., 219, 345 (1984).

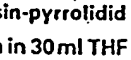
SPro	L-Thioprolin (L-Thiazolidin-4-carbonsäure)
AcOH	Essigsäure
Boc	tert. Butyloxycarbonyl
CAIBE	Chlorkohlensäureisobutylester
DC	Dünnschichtchromatogramm, -chromatographisch
DP IV	Dipeptidyl Peptidase IV
d. Th.	der Theorie
EE	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
Fp	Schmelzpunkt
h	Stunde(n)
i. Vak	im Vakuum
LM	Lösungsmittel
MeOH	Methanol
Min.	Minuten
NEM	N-Ethylmorpholin
OPfp	Pentafluorphenylester
pNA	4-Nitroanilid
RT	Raumtemperatur
SC	Säulenchromatographie, -chromatographisch
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
$Z(NO_2)$	4-Nitrobenzyloxycarbonyl

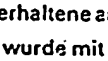
Unter „üblicher Aufarbeitung" versteht man:
Nach beendeter Kupplungsreaktion wird das jeweilige Rohprodukt in Essigester aufgenommen und die Lösung nacheinander zweimal mit Wasser (NaCl-gesättigt), dreimal mit 5%iger $KHSO_4$-Lösung, zweimal mit Wasser, dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und dreimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und das Rohprodukt durch Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum isoliert.
Folgende Laufmittelssysteme (in Volumenanteilen) zur Dünnschichtchromatographie auf Silicagel-Fertigplatten (Silufol UV 254, CSSR) wurden verwendet:

BAE	Benzen-Aceton-Essigsäure	70 + 30 + 1,5
BAW	2-Butanol-Ameisensäure-Wasser	75 + 15 + 20
BEWE	1-Butanol-Essigsäure-Wasser-Essigester	20 + 20 + 20 + 20
BPEW	1-Butanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser	30 + 20 + 6 + 24
CM	Chloroform-Methanol	90 + 10
EPEW	Essigester-Pyridin-Essigsäure-Wasser	90 + 15 + 4,5 + 2,3

Zur Ermittlung der inhibitorischen Aktivität der erfindungsgemäß synthetisierten DP IV-Inhibitoren wurden die Ki-Werte durch Auftragung nach Dixon (in: J. Lasch, Enzymkinetik, Fischer-VLG. Jena 1987) 1/vi gegen [I] aus dem Schnittpunkt von mindestens 3 Geraden ermittelt.
vi – gemessene Initialgeschwindigkeit der DP IV-katalysierten Hydrolyse des Substrates Ala-Pro-pNA
[I] – Konzentration des als DP IV-Inhibitor untersuchten Aminosäureamides im Meßansatz
Die Messungen wurden bei pH 6,3 in 0,04 M Phosphatpuffer durchgeführt. Die Ionenstärke betrug 0,125, eingestellt mit Kaliumchlorid. Die Temperatur des Meßansatzes betrug 30°C. Die Bestimmung des Wertes für vi wurde bei jeder Substrat- und Inhibitorkonzentration 3fach durchgeführt.

Beispiel I

N^{ε}-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin-pyrrolidid · hydrochlorid (H–Lys[$Z(NO_2)$]–N  · HCl)

2,95 g Boc–Lys[$Z(NO_2)$]–OH wurden in 30 ml THF gelöst und bei –15°C mit 880 µl NEM und 900 µl CAIBE versetzt. Nach 6 Min. wurden 573 µl Pyrrolidin bei –15°C zugegeben. Man ließ 1 h bei –15°C und über Nacht bei RT rühren. Die Aufarbeitung erfolgte wie üblich. Das nach Trocknen i. Vak. erhaltene amorphe Boc–Lys[$Z(NO_2)$]–N  wurde in 20 ml 1,1 N HCl/AcOH gelöst und 30 Min. bei RT gelassen. Das Produkt wurde mit Ether ausgefällt und anschließend aus MeOH/Ether umkristallisiert. Die weitere Reinigung erfolgte SC an Sephadex G 10 mit 0,1 M AcOH als Elutionsmittel.

Ausbeute:
Fp: 157–160°C
$[\alpha]_D^{20}$: +9,67° (c = 1, AcOH)
DC: einheitlich in BAW, BEWE und BPEW
Ki: $(3{,}46 \pm 0{,}5) \cdot 10^{-7}$ M

Beispiel II

L-Valin-pyrrolidid · hydrochlorid (H–Val–N ⟨⟩ · HCl)

1,086 g Boc–Val–OH wurden in 20 ml EE gelöst und bei −20 °C mit 640 µl NEM und 650 µl CAIBE versetzt. Nach 8 Min. fügte man 413 µl Pyrrolidin zu und ließ 1 h bei −20 °C und über Nacht bei RT rühren. Di Aufarbeitung erfolgte wie üblich. Das ölige Boc–Val–N ⟨⟩ wurde bei RT 30 Min. mit 3 N HCl/EE behandelt. Nach Einengen des LM i. Vak. kristallisierte das Pr dukt aus EtOH/EE in farbl sen Nadeln aus.

Ausbeute:	620 mg (60,3 % d. Th.)
Fp:	178–180 °C
$[\alpha]_D^{20}$:	+33,93° (c = 1, AcOH)
DC:	einheitlich in BAW, BEWE und BPEW
Ki:	$(4{,}75 \pm 0{,}7) \cdot 10^{-7}$ M

Beispiel III

L-Isoleucin-pyrrolidid · hydrochlorid (H–Ile–N ⟨⟩ · HCl)

1,98 g Boc–Ile–OPfp wurden in 15 ml THF gelöst und bei 0 °C mit 450 µl Pyrrolidin und 280 µl TEA versetzt. Man ließ 1 h bei 0 °C und 1 h bei RT rühren. Nach Abziehen des LM i. Vak. wurde der Rückstand in EE aufgenommen und mit H_2O, $KHSO_4$-Lösung und H_2O gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Der EE wurde i. Vak. abgezogen und das ölige Boc–Ile–N ⟨⟩ 30 Min. bei RT mit 15 ml 1,1 N HCl/AcOH behandelt. Das Produkt wurde zunächst mit Ether ausgefällt, abgesaugt, im Exsikkator über KOH und P_2O_5 getrocknet und anschließend aus Isopropanol/Diisopropylether umkristallisiert.

Ausbeute:	760 mg (68,8 % d. Th.)
Fp:	179–184 °C
$[\alpha]_D^{20}$:	+29,31° (c = 1, AcOH)
DC:	einheitlich in BAW, BEWE und BPEW
Ki:	$(2{,}43 \pm 0{,}1) \cdot 10^{-7}$ M

Beispiel IV

L-Thioprolin-pyrrolidid · hydrochlorid

IV.1. Boc–SPro–N ⟨⟩

888 mg Boc–SPro–OH wurden in 10 ml THF gelöst und nach Abkühlen auf −20 °C unter Rühren mit 484 µl NEM und 495 µl CAIBE versetzt. Nach 8 Min. fügte man bei −20 °C 443 µl Pyrrolidin hinzu, ließ die Reaktionsmischung noch 1 h bei −20 °C und über Nacht bei RT rühren. Danach wurde i. Vak. eingeengt, der Rückstand in EE aufgenommen und wie üblich aufgearbeitet. Nach Aufnehmen des öligen Rückstandes mit n-Hexan setzte Kristallisation ein.

Ausbeute:	416 mg (38 % d. Th.)
Fp:	108–109 °C
$[\alpha]_D^{26}$:	−154,2° (c = 0,62, AcOH)
DC:	einheitlich in BAE, CM, EPEW

IV. 2. H–SPro–N ⟨⟩ · HCl

265 mg Boc–SPro–N ⟨⟩ wurden in 3 ml 1,1 N HCl/AcOH gelöst, mit 300 µl Thioanisol versetzt und 30 Min. bei RT stehengelassen. Anschließend engte man i. Vak. ein, versetzte den Rückstand mit Ether und kristallisierte aus $CHCl_3$/Ether um.

Ausbeute:	182 mg (88 % d. Th.)
Fp:	164–166 °C
$[\alpha]_D^{26}$:	−122,7° (c = 0,62; AcOH)
DC:	einheitlich in BAW, BEWE, BPEW
Ki:	$(3{,}95 \pm 0{,}4) \cdot 10^{-5}$ M

Beispiel V

L-Isoleucin-thiazolidid · hydrochlorid

V.1. Boc–Ile–N ⟨S⟩

2,31 g Boc–Ile–OH wurden in 10 ml THF gelöst und bei −20 °C unter Rühren mit 1,27 ml NEM und 1,3 ml CAIBE versetzt. Nach 8 Min. fügte man bei −20 °C 1,26 g Thiazolidin-hydrochlorid und weitere 1,27 ml NEM hinzu, ließ das Reaktionsgemisch noch 1 h bei −20 °C 1,26 g Thiazolidin-hydrochlorid und weitere 1,27 ml NEM hinzu, ließ das Reaktionsgemisch noch 1 h bei −20 °C und über Nacht bei RT rühren. Danach wurde der Ansatz i. Vak. eingeengt, der Rückstand in EE aufgenommen und wie üblich aufgearbeitet. Der ölig Rückstand wurd durch Flash-Chr matographi an Kieselgel mit Ether/n-Hexan (1:1) gereinigt.

Ausbeute:	952 mg (31 % d. Th.)
$[\alpha]_D^{26}$ (Öl):	−14,1 °C (c = 0,6, AcOH)
DC:	einheitlich in BAE, CM, EPEW

V.2. H-Ile-N  · HCl

790 mg Boc-Ile-thiazolidid wurden in 8 ml 1,1 N HCl/AcOH gelöst, mit 800 µl Thioanisol versetzt und 30 Min. bei RT stehengelassen. Danach wurde der Ansatz i. Vak. eingeengt und das Produkt mit Ether ausgefällt.

Ausbeute:	584 mg (94 % d. Th.)
Fp:	116–120 °C
$[\alpha]_D^{20}$:	+18,6° (c = 0,77, AcOH)
DC:	einheitlich in BPEW, BEWE, BAW
Ki:	$(1{,}23 \pm 0{,}2) \cdot 10^{-7}$ M